



ORIGINAL ARTICLES

농산물에서 분리한 무름병균의 항생제 최소 억제농도 조사

김다운¹ · 김나예슬¹ · 김채린¹ · 정명인¹ · 오광교¹ · 김보은¹ · 류재기¹ · 정지은¹ · 지삼너² · 류경열^{1*}¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, ²농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구소Investigation of Antimicrobial Minimum Inhibitory Concentration of *Pectobacterium* spp. Isolated from Agricultural ProduceDawoon Kim¹, Nayeseul Kim¹, Chaerin Kim¹, Myung-In Jeong¹, Kwang Kyo Oh¹, Bo-Eun Kim¹, Jae-Gee Ryu¹, Jieun Jung¹, Samnyu Jee², Kyoung-Yul Ryu^{1*}¹Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeollabuk-do 55365, Korea²Highland Agriculture Research Institute, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Pyeongchang, Gangwon 25342, Korea

(Received on November 3, 2021. Revised on December 8, 2021. Accepted on December 8, 2021)

Abstract *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*(Pcc) causes the destructive bacterial soft rot on a wide range of crops in Korea. This study was conducted to elucidate the characteristics and antimicrobial response of soft rot isolates collected from chinese cabbage, radish and potato cultivation areas. The pathogenicity on potato, carrot, chinese cabbage and lettuce were evaluated according to severity of bacterial soft rot at different temperature after inoculation. Isolates collected from winter chinese cabbage showed strong pathogenicity in four tested crop and produced the similar symptom in wide range temperature from 10 to 30°C. The minimum inhibitory concentration (MIC) of streptomycin and tetracycline were investigated for 76 soft rot isolates obtained from different cultivation regions. The soft rot bacteria showed the various response against two agricultural antibiotics, and four isolates were not inhibited at over 100 µg/mL concentration of streptomycin. Recently isolated soft rot bacteria showed over the two times high minimum inhibitory concentration of streptomycin and tetracycline compared to them isolated 20 years ago. Also, the soft rot bacteria were tested minimum inhibitory concentration of 16 antibiotics using sensititre instrument system and showed minimum inhibitory concentration against nalidixic acid ranged from 2 to 128 µg/mL. These results provide the fundamental information on change of antibiotics response associated with soft rot bacteria and the further studies are necessary for management of agricultural antibiotics resistance.

Key words *Pectobacterium carotovorum*, Antibiotics, Minimum inhibitory concentration (MIC)

서론

무름병은 그람음성 세균인 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*(Pcc)에 의하여 발생한다. 무름병의 병징은 처음에 표면에서 물기가 묻어나는 것처럼 보이고 점차로 병이 진전하면 독특한 냄새가 나고 액체처럼 호물호물해지는 부패증상을 유발하여 다른 병과 쉽게 구별이 된다. 무름

병균은 기주범위가 넓고 토양에서 오랫동안 생존이 가능하며, 작물의 전 생육기간에 발생하는데 한번 감염되면 빠른 속도로 다른 조직으로 전이되고 저장 중에도 발생하기 때문에 경제적 손실이 큰 식물병 중의 하나이다.

최근 기후변화로 인한 이상 기온으로 다양한 병해충이 작물재배지에서 발생하고 있다. 국내에서 발생하는 병해는 한국병명목록(The Korean Society of Plant Pathology, 2021)에 1,470여 종이 보고되었다. 그 중에서 무름병을 일으키는 병해는 66종이 46개 기주에서 발생하고, *Pectobacterium*속 세균에 의하여 발생하는 무름병은 36개가 보고되었다.

*Corresponding author
E-mail: kyryu@korea.kr

국내에서 발생하는 *Pectobacterium*속 병원균은 유전적 특성에 기반하여 18종으로 분류하였지만, 감자, 배추, 무 재배지는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), *Pectobacterium odoriferum* (Pod), *Pectobacterium brasiliense* (Pbr) *Pectobacterium versatile* (Pvr), *Pectobacterium polaris* (Ppo), *Pectobacterium parmentieri* (Ppa)의 6종이 분포한다고 하였고 유전특성, 탄소원 이용, 병원성, 운동성, 펙틴분해 효소 활성과 온도반응을 조사하여 보고하였다(Jee et al., 2020).

작물의 무름병을 방제하기 위한 살균제로 농업용 항생제와 동제를 사용하고 있다. 농업용 항생제는 옥솔린산, 발리다마이신, 스트렙토마이신, 가스가마이신, 옥시테트라사이클린이 있고, 동제는 코퍼하이드록사이드, 코퍼셀페이트 등을 등록하여 사용하고 있다(Korea Crop Protection Association, 2020). 농용항생제는 대부분 단제로 사용하고 있지만, 두 종류 항생제를 합제로 등록하여 무름병의 방제수단으로 사용하기도 한다. 최근에는 농용항생제 사용을 줄이고 내성 발달을 최소화하기 위하여 길항미생물을 이용하거나 무름병균에 특이적으로 감염하여 용균시키는 박테리오파지를 방제수단으로 이용하고 있다.

작물에 발생하는 병해에 대한 방제효과를 높이고 저항성 균 출현을 최소화하기 위하여 다양한 작용기작이 있는 농약이 사용되고 있으나 아직까지 내성발달에 관한 연구보고는 적었다(Chiou and Jones 1995; McGhee et al., 2011; Foster et al., 2015; Sundin and Wang 2018). 살균제의 약제 저항성 연구는 당근검은잎마름병을 일으키는 *Alternaria dauci*에 대한 살균제 효과검정 및 병원균 집단의 저항성 연구에서 fludioxonil에 대한 저항성 균주를 발견하였고, iprodione과 procymidone에 대하여 교차저항성을 보고하였다(Do et al., 2020). 특히 국내에서 농용항생제 저항성에 대한 연구는 많지 않아 참다래쾌양병원균인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 스트렙토마이신 저항성 관련 보고가 있을 뿐이다. 이 연구에 따르면 2008~2017년에 분리한 734개 키위쾌양병원균 가운데 38개 균주가 스트렙토마이신에 대하여 저항성이라고 보고하였다(Lee et al., 2020).

농산물과 관련하여 들깨 잎에서 분리한 포도상구균의 항생제 감수성 분석결과도 독소형 유전자 보유집단에 따라 항생제 반응이 크게 다르며 항생제에 대한 다제내성균의 비율이 매우 높다고 보고하였다(Kim et al., 2015).

본 연구는 농작물에서 큰 피해를 유발하는 무름병균의 병원성과 온도반응 특성을 조사하고자 실시하였다. 그리고 항생제 반응은 무름병균의 최소억제농도를 E-test법과 Sensititre ARIS Hi-Q로 분석하여 안정적인 병해관리와 항생제 내성 최소화를 위한 관리대책에 필요한 기초자료를 확보하고자 수행하였다.

재료 및 방법

병원균 분리

무름병균은 배추 무 재배지에서 무름병징을 보이는 시료로부터 분리하였다. 병원균 분리는 1% 차염소산나트륨으로 병든 시료를 표면 소독하고 종이수건으로 수분을 제거하여 표면을 건조시켰다. 병원균 분리에 사용한 감자는 수돗물로 깨끗이 세척한 다음 70% 에탄올로 분무처리하고 30초 이상 알콜램프로 화염소독하여 표면에 부착한 오염원을 제거하였다. 화염 소독한 감자는 10 mm 두께로 절단하여 습실 처리된 페트리 접시에 배치하고 병든 시료 조직을 조심스럽게 올려 두었다. 그 다음 플라스틱 지퍼백에 넣고 28°C 항온기에서 24시간 배양 후 특이적인 무름병징 발생여부를 확인하고 병원균 분리에 사용하였다. 감자절편에 새롭게 형성된 무름병징에서 병원균을 채취하여 CVP (Crystal violet pectate agar, MDcell) 배지에 도말 후 단일 균총을 이용하여 26개 병원균을 분리하였다. 분리균은 TSA (Tryptic Soy Agar, Difco) 배지에 보관하며 실험에 사용하였다. 한편 감자, 배추, 무에서 분리한 무름병균 가운데 10균주는 고령지농업연구소에서 분양받았고, 다른 40균주는 국립농업과학원 유해생물과에서 2000년대 분리하여 보관중인 균주로 실험에 사용하였다.

Biolog, 16S rRNA 이용 무름병균 동정

농산물에서 분리한 병원균은 TSA (Tryptone Soy Agar, Difco)에 도말 후 28°C 항온기에서 24시간 배양하였다. 병원균 colony를 멸균된 면봉으로 채취하여 접종액(Inoculating Fluid)에 조심스럽게 풀어주고, 탁도계(Nephelometer)를 이용해 맥파랜드 표준용액(McFarland equivalence turbidity standard)의 탁도를 0.5로 조절하였다. 그 후 접종액은 멀티 채널 피펫을 이용하여 100 µL씩 GENIII MicroPlate (Biolog)에 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 보라색으로 변색된 plate는 Biolog 마이크로 스테이션을 이용하여 미생물을 동정하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 (주)솔젠트에 의뢰하여 BLAST 방법으로 Genebank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 자료와 비교 분석하여 병원균 동정에 이용하였다.

기주별 병원성 및 온도반응 조사

농산물에서 분리한 무름병균 26 균주(국립농업과학원)와 분양받은 10균주(고령지농업연구소)의 병원성과 온도반응은 감자, 당근, 배추, 로메인 상추를 사용하여 조사하였다. 감자와 당근은 수돗물로 깨끗이 세척하고 종이수건으로 표면의 수분을 제거하여 70% 알코올로 30초 이상 표면을 화염소독 한 후 10 mm 두께로 절단하였고, 상추와 배추는 표면의 수분을 제거 후 5 × 5 cm 크기로 절단하여 준비하였다.

준비한 시료는 사각 페트리 접시에 종이수건을 넣고 멸균증류수로 수분을 공급하여 습실조건을 만들고 4종의 기주 시료를 배치하였다. 그리고 무름병균은 6.0 log cfu/mL로 조절하여 10 µL씩 3개 위치에 3반복으로 접종하였고 온도별 병원성 반응을 조사하기 위하여 항온기를 10, 15, 20, 25, 30°C로 조절하여 24시간 동안 배양하고 기주별 병원성 및 온도반응 정도를 무병징(-) 약(+), 중간(++), 강함(+++)으로 구분하였다.

항생제 최소억제농도 조사

E-test - MC

TSA에 배양된 무름병균 균층은 백금이로 취하여 멸균증류수 5.0 ml가 담긴 유리관에 넣고 완전하게 풀어 접종액을 만들었다. 그리고 탁도계(Nephelometer)를 이용하여 탁도 0.5가 되도록 맥파랜드 표준용액(McFarland equivalence turbidity standard)으로 조절하고 Retro C80 (Biomerieux)에 MHA (Mueller Hinton Agar, Difco) 배지를 올린 후 면봉을 이용하여 탁도를 맞춘 접종액을 골고루 퍼지게 배지 표면에 처리하였다. 접종액이 배지표면에서 충분히 마른 후 streptomycin (0.064~1,024 µg/mL), tetracycline (0.016~256 µg/mL)이 처리된 E-test (Biomerieux 제품) stripe을 배지에 올려놓고, 기포를 제거한 다음 28°C 항온기에 18-24 h 배양하였다. 그리고 MHA 배지 표면에서 자라는 병원균의 억제 반응 크기를 기준으로 해당 항생제에 대한 최소억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration)로 조사하였다(Bolmström et al., 2007).

Sensititre ARIS HIQ - MC

TSA에 배양된 무름병균 균층을 백금이로 취하여 멸균증류수 5.0 mL가 있는 유리관에 조심스럽게 넣고 완전하게 풀어 혼탁액을 만든다. 탁도계(Nephelometer)를 이용하여 0.5 McFarland standard로 5.0 mL Glass tube 의 농도를 맞추는 방법은 E-test와 동일하다. 그 후 Muller Hinton Broth (MHB) Tube에 농도를 조절된 접종액을 10 µL를 넣고 충분히 혼합하였다. 그리고 무름병균의 최소억제농도 조사 대상 항생제는 16종으로 각각의 특성에 따라 조절된 농도로 사용하였다. 항생제별 처리농도(µg/mL)는 Amikacin (4~64, AMI), Ampicillin (2~64, AMP), Azithromycin (2~32, AZI), Cefotaxime (1~32, FOT), Cefoxitin (4~32, FOX), Cefazidime (1~32, TAZ), Ceftriaxone (1~32, AXO), Chloramphenicol (2~32, CHL), Ciprofloxacin (0.03~16, CIP), Colistin (2~16, COL), Gentamicin (1~64, GEN), Imipenem (1~8, IMI), Nalidixic Acid (2~128, NAL), Streptomycin (2~128, STR), Tetracycline (2~128, TET), Trimethoprim/Sulphamethoxazole (1/19~16/304, SXT)로 준비된 plate에 자동분주기(Sensititre

AIM)를 이용하여 무름병균 혼합액을 50 µL씩 접종하고 Sensititre ARIS Hi-Q (Thermo scientific)로 28°C에서 18-24시간 배양하고 자동형광분석장비(Sensititre Optiread)를 사용하여 항생제 반응을 조사하였다(Jones et al., 2015).

결과 및 고찰

무름병균의 분류동정

2021년에 농작물에서 분리한 26개 무름병균은 Biolog 탄소원 이용 특성을 반영한 결과 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*으로 동정되었다. 그런데 이들은 16S rRNA 유전특성에 따라 동정했을 때는 *Pectobacterium carotovorum* (34.6%), *Pectobacterium aroidearum* (26.9%), *Pectobacterium odoriferum* (23.1%), *Pectobacterium polaris* (15.4%)의 4종으로 분류되었다(Table 1). 이 결과는 *Pectobacterium odoriferum* (32.4%), *Pectobacterium carotovorum* (27.6%), *Pectobacterium brasiliense* (25.8%) *Pectobacterium versatile* (12.4%) *Pectobacterium polaris* (0.9%) *Pectobacterium parmentieri* (0.9%) 순으로 분포한다는 보고(Jee et al., 2020)와 유사하였고 이는 분리기주, 분리지역, 농장의 작물재배이력 등과 관련성이 높을 것으로 판단되었다. Jee et al. (2020)이 분리한 225개 균주는 90% 이상이 감자에서 분리하였고, 배추에서 18 균주, 무에서 5 균주를 분리했다고 보고하였다. 본 연구에서는 배추에서 21 균주를 분리하였고 우점균은 *Pectobacterium carotovorum*였으나, 무에서 분리한 5균주는 *Pectobacterium aroidearum*이 우점균으로 확인되었다. 이는 감자에서 분리한 무름병균의 우점균인 *Pectobacterium odoriferum*과 분포비율이 다르게 나타났으며 배추 무의 분포와 지역별 특성의 지속적인 조사 및 비교 연구가 필요하였다.

무름병균의 기주 및 온도반응

배추 무에서 2021년 분리한 26 균주와 분양받은 10 균주의 무름병균은 접종 후 25~30°C에서 24시간 이후 감자에서 심한 무름병징이 나타났고, 당근, 배추 상추에서는 유사한 수준으로 병징을 유발하였다(Table 2). 이는 Jee et al. (2020)의 20~37°C 온도 범위에서 발생한 무름병징 보고와 유사한 결과를 보였으나 10~15°C에서는 차이가 있었다. 무름병균을 접종하고 15~20°C 항온기에 배양하였을 때 병징 발생은 감자 > 당근 > 배추 > 상추 순으로 심하게 나타났다. 10°C에서 감자는 뚜렷한 병징 발현이 있었으나 당근 배추 상추에서는 큰 차이를 보이며 약한 병징이 발생하였다. 특히 배추에서 분리한 무름병균이 감자에서 가장 심한 병징을 유발하여 분리 균주 간 연관분석이 필요하여 추가실험이 진행 중에 있다. 최근에는 작물이 연중재배 되어 병원균은 다양한 재배환경에서 생존하며 병원성의 변화가 발생할 수 있

Table 1. Identification of soft rot bacteria obtained from agricultural produces

Isolate	Host	Year	Biolog	16S rRNA
HCp3-1 ^{a)}	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. polaris</i>
HCp3-2	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. polaris</i>
HCp3-3	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. polaris</i>
HCp5-1	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearums</i>
HCp5-2	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearums</i>
HCp6-1	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
HCp6-2	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
HCp6-3	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
HCp6-4	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
HCp7-1	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. polaris</i>
MjRa2	Radish	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearum</i>
MjRa3	Radish	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearum</i>
MjRa4	Radish	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearum</i>
MjRa5	Radish	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearum</i>
MjRa6	Radish	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. aroidearum</i>
MjCaA1	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
MjCaA2	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
MjCaA3	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
MjCaA5	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>
MjCaA6	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>
MjCaA7	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>
MjCaA8	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>
MjCaA10	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>
MjCaB1	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
MjCaB2	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. carotovorum</i>
MjCaB3	Cabbage	2021	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>P. odoriferum</i>

^{a)} These isolates obtained from Chinese cabbage and radish cultivation area in 2021.

으므로 저온과 고온에서 병원균의 특성 변화를 연구하는 것은 안전관리 측면에서 중요하다. 무름병은 기후변화로 인해 발생이 증가하고 고온에서 강한 병원성 있을 것으로 예상되지만 Jee et al. (2020)의 보고에 따르면 37°C 이상의 고온에서는 병원성이 나타나지 않았다. 본 연구에서는 저온에서도 강한 병원성을 유발하는 무름병균이 확인되었는데 이는 본 연구에 사용된 균이 저온에 대한 적응력이 획득된 것이 아닌가는 추가연구가 필요하다.

항생제 최소억제농도

무름병균의 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(tetracycline)에 대한 최소억제농도는 2021년에 분리한 36균주와 2000년대에 분리한 40균주를 이용하여 E-test 방법으로 조사하였다(Table 3). 그 결과 최근에 분리한 3균주와 2000년대에 분리한 2균주가 스트렙토마이신 100 µg/mL 농도에서도 왕성하게 증식하였다. 그리고 대조균주 KACC 10057은 스트렙토마이신 최소억제농도가 0.4 µg/mL이었으

나, 2021년에 분리한 균주는 대조균주에 비하여 10배 이상 높은 4.0 µg/mL에서 억제되는 비율이 60% 수준이었다. 무름병균은 스트렙토마이신에 대한 평균 최소억제농도가 2000년대에는 3.04 µg/mL이었으나 2021년에는 6.64 µg/mL로 2배 높은 수준으로 억제농도가 증가하였다. 그리고 무름병균의 테트라사이클린에 대한 항생제 반응도 조사하였다. 2000년대에 분리한 무름병균은 평균 최소억제농도는 0.48 µg/mL이었으나, 최근에 분리한 균주는 1.13 µg/mL으로 2배 이상으로 증가하였다. 그리고 무름병 대조균주 KACC 10057은 스트렙토마이신 최소억제농도는 0.19 µg/mL이었으나, 그보다 5배 높은 1.0 µg/mL 수준인 균주가 2000년대의 10% 수준에서 최근에는 53%로 증가 하였다. 그러나 축산물에서 분리한 병원성대장균이 테트라사이클린에 대하여 저항성 반응을 보이는 균주가 26% 이었다고 보고(Lee et al., 2021)한 것과 다르게 무름병균은 저항성 반응을 보이는 균주가 없었다. 이와 같이 무름병균이 스트렙토마이신, 테트라사이클린 항생제에 대하여 다른 반응 특성을 보이는 것은

Table 2. Comparison of pathogenicity and temperature response of soft rot bacteria isolated from agricultural produces

Isolate	Potato					Carrot					Lettuce					Chinese cabbage				
	10 ^{a)}	15	20	25	30	10	15	20	25	30	10	15	20	25	30	10	15	20	25	30
HCp3-1	+++ ^{b)}	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+	+	++	++
HCp3-2	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+	++	++	+++	++	+	++	+++	+++	++
HCp3-3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	++	++	+	+	++	++	++
HCp5-1	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	++
HCp5-2	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+	++	++	++	+++
HCp6-1	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++	+	+++	+	+	+	+++	+++	+	++	++	+++	+++
HCp6-2	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	++	+	++	++	+++	+++
HCp6-3	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++
HCp6-4	+	+++	+++	+++	+++	-	+	++	++	++	-	-	+	++	++	-	+	+	++	+++
HCp7-1	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	+	++	+++	+++
MjRa2	++	++	++	+++	+++	+	+	+	++	++	-	-	+	++	+++	+	+	+	++	+++
MjRa3	++	++	++	+++	+++	+	+	++	++	+++	-	+	+	+++	+++	-	+	+	++	+++
MjRa4	++	++	++	+++	+++	+	+	+	++	++	+	+	+	++	+++	-	-	++	++	+++
MjRa5	++	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	+	+	++	++
MjRa6	++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	-	+	+	+++	++
MjCaA1	++	++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	+	+	+	++	+++	-	+	+	+++	++
MjCaA2	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	+++	-	+	+	+++	+++	-	+	+	++	+++
MjCaA3	++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	+	+++	+++
MjCaA5	++	++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	+	+	++	+++
MjCaA6	+	+	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
MjCaA7	+	++	+++	+++	+++	+	+	+	++	+++	-	+	+	+++	+++	+	+	+	+++	+++
MjCaA8	++	++	+++	+++	+++	-	+	++	++	+++	-	-	+	+++	++	+	+	+	+++	+++
MjCaA10	++	++	+++	+++	+++	+	+	++	++	+++	-	+	+	+++	+++	-	+	+	++	++
MjCaB1	++	++	++	+++	++	+	++	++	++	++	+	+	+++	+++	+++	+	++	++	+++	+++
MjCaB2	+	++	+++	+++	+++	-	++	++	++	+++	-	++	++	+++	+++	+	+	++	+++	+++
MjCaB3	-	-	-	+++	+++	-	-	-	++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++
PJ5	+	+	+	++	++	+	+	++	+++	+++	-	+	+	+	+	-	+	++	++	+++
PJ19	+	+++	+++	+++	+++	-	+	++	++	+++	-	-	+	++	++	-	-	+++	+++	+++
JP2	+	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	-	+	++	+++	+++
JP9	-	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	+	-	+++	-	+	+	++	+++
BP201605	+	++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	-	+	+	+	++	-	+	++	+++	+++
BP201606	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+	++	-	-	++	+++	+++
MJP201704	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	-	-	+++	-	-	++	+++	+++
MJP201705	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	+	-	++	+++	-	+	++	+++	+++
PDP201710	+	++	++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+	++	-	-	+	+++	+++
PDP201714	+	++	+++	+++	+++	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+	+++	-	-	+	++	+++
KACC 10057	-	++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	++

^{a)} Incubation temperature (°C) after inoculation with soft rot bacteria

^{b)} Symptom produced by soft rot bacteria: - no, + weak, ++ intermediate, +++ strong

농약사용, 축분퇴비 및 관계수 등과 관련되었을 것으로 생각되어 지속적인 모니터링과 항생제 유입경로 구명이 필요하다고 판단된다.

식물병원균의 항생제 저항성 여부는 최소억제농도를 근거로 하여 평가하고 있다. 최근에 키위에서 분리한 *Pseudo-*

monas syringae pv. *actinidiae* 균주들의 스트렙토마이신 저항성 연구에서 100 µg/mL 농도 수준으로 조절된 배지에서 병원균 성장여부로 판단하였고, 조사균주의 5.2%가 저항성 반응을 보였다고 보고하였다(Lee et al., 2020). 농업용 항생제 스트렙토마이신의 안전사용기준이 100~260 µg/mL (10~

Table 3. Minimum inhibitory concentration by e-test method of soft rot bacteria isolated from agricultural produces

List	Isolate	Antibiotics		List	Isolate	Antibiotics	
		Streptomycin	Tetracyclin			Streptomycin	Tetracyclin
1	Pcc1	4 ^{a)}	0.38	40	Pcc43	2	0.5
2	Pcc2	>100	0.75	41	HCp3-1	1	1.5
3	Pcc3	4	0.5	42	HCp3-2	1.5	1.5
4	Pcc4	1.5	0.5	43	HCp3-3	1	1.5
5	Pcc5	4	0.5	44	HCp5-1	2	7.5
6	Pcc6	4	0.39	45	HCp5-2	1.5	1.5
7	Pcc7	3	0.39	46	HCp6-1	4	2
8	Pcc9	4	1	47	HCp6-2	4	1.5
9	Pcc10	4	1	48	HCp6-3	1.5	2
10	Pcc11	1	0.19	49	HCp6-4	2	1.5
11	Pcc12	1	0.38	50	HCp7-1	1.5	1.5
12	Pcc13	1	0.38	51	MjRa2	4	0.25
13	Pcc14	1	1	52	MjRa3	4	0.25
14	Pcc15	6	0.25	53	MjRa4	4	0.25
15	Pcc16	6	0.5	54	MjRa5	6	0.25
16	Pcc17	6	0.5	55	MjRa6	6	0.19
17	Pcc18	3	0.38	56	MjCaA1	6	0.38
18	Pcc19	4	0.75	57	MjCaA2	6	0.5
19	Pcc21	3	0.75	58	MjCaA3	6	0.5
20	Pcc22	4	1	59	MjCaA5	6	0.19
21	Pcc23	4	0.75	60	MjCaA6	8	0.19
22	Pcc25	4	0.38	61	MjCaA7	6	0.19
23	Pcc26	4	0.5	62	MjCaA8	6	0.25
24	Pcc27	6	0.38	63	MjCaA10	4	0.19
25	Pcc28	>100	0.38	64	MjCaB1	0.4	0.38
26	Pcc29	2	0.25	65	MjCaB2	0.4	0.38
27	Pcc30	2	0.25	66	MjCaB3	0.6	0.38
28	Pcc31	6	0.75	67	PJ5	2	1
29	Pcc32	3	0.25	68	PJ19	3	2
30	Pcc33	4	0.5	69	JP2	>100	2
31	Pcc34	2	0.125	70	JP9	>100	1.5
32	Pcc35	3	0.5	71	BP201605	3	2
33	Pcc36	2	0.75	72	BP201606	3	2
34	Pcc37	1	0.19	73	MJP201704	2	1.5
35	Pcc38	1.5	0.125	74	MJP201705	>100	1
36	Pcc39	0.5	0.125	75	PDP201710	2	0.5
37	Pcc40	2	0.125	76	PDP201714	2	2
38	Pcc41	0.5	0.5	77	Pcc KACC 10057	0.4	0.19
39	Pcc42	0.5	0.25	78			

^{a)} Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of soft rot bacteria investigated by E-test method.

25 g/20 L)으로 제품에 따라 처리량이 다르기 때문에 최소억제농도에 근거하여 병원체의 저항성 연구를 수행했을 것으로 생각되었다. 이번 연구에서 무름병을 일으키는 *Pecto-*

bacterium carotovorum subsp. *carotovorum*도 안전사용기준을 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 항생제 반응평가를 수행한 76개 균주 가운데 6.6%에 해당하는 5개 균주가 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 최

Table 4. Minimum inhibitory concentration by sensititre Hi-Q of soft rot bacteria isolated from potato, chinese cabbage and radish in Korea

Isolate	AMI ^{a)}	AMP	AZI	FOT	FOX	TAZ	AXO	CHL	CIP	COL	GEN	IMI	NAL	STR	TET	SXT
HCp3-1	4 ^{b)}	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	2	2	1
HCp3-2	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	2	2	1
HCp3-3	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	2	2	1
HCp5-1	4	2	2	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
HCp5-2	4	2	2	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
HCp6-1	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
HCp6-2	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
HCp6-3	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
HCp6-4	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
HCp7-1	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	2	2	1
MjRa2	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjRa3	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjRa4	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjRa5	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjRa6	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjCaA1	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaA2	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjCaA3	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MjCaA5	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaA6	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaA7	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaA8	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaA10	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MjCaB1	4	2	8	1	4	1	1	4	0.06	2	1	1	64	4	2	1
MjCaB2	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	64	2	2	1
MjCaB3	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	64	2	2	1
PJ5	4	2	2	1	4	1	1	2	0.06	2	1	1	128	4	2	1
PJ19	4	2	4	1	4	1	1	8	0.03	2	1	1	2	4	2	1
JP2	4	2	4	1	4	1	1	4	0.12	2	1	1	128	128	2	1
JP9	4	2	2	1	4	1	1	4	0.12	2	1	1	128	128	2	1
BP201605	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
BP201606	4	2	8	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
MJP201704	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
MJP201705	4	2	8	1	4	1	1	4	0.25	2	1	1	128	128	2	1
PDP201710	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1
PDP201714	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	4	4	2	1
KACC 10057	4	2	4	1	4	1	1	4	0.03	2	1	1	2	4	2	1

^{a)} AMI (Amikacin), AMP (Ampicillin), AZI (Azithromycin), FOT (Cefotaxime), FOX (Cefoxitin), TAZ (Ceftazidime), AXO (Ceftriaxone), CHL (Chloramphenicol), CIP (Ciprofloxacin), COL (Colistin), GEN (Gentamicin), IMI (Imipenem), NAL (Nalidixic Acid), STR (Streptomycin), TET (Tetracycline), SXT (Trimethoprim/Sulphamethoxazole)

^{b)} Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of soft rot bacteria investigated by sensititre ARIS Hi-Q system.

소억제농도를 보여 저항성균으로 판단하였다. 그러나 테트라사이클린에 대해서는 0.12~7.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 최소억제농도를 보여 저항성 균주는 없었다.

식물병원성 세균의 항생제 저항성 기작은 대개 두 가지로 알려져 있다. 스트렙토마이신의 표적위치인 리보솜의 단백질을 암호화 하는 *rpsL* 유전자에 단일염기 돌연변이가 발

생하는 경우와 무름병균이 *strA-strB* 유전자 복합체를 얻게 되는 경우가 그것이다(Chiou and Jones 1995; McGhee et al., 2011; Foster et al., 2015; Sundin and Wang, 2018).

2021년에 분리한 무름병균의 의료용 항생제 16종에 대한 반응은 sensititre(ARIS HiQ, Thermo scientific)를 이용하여 최소억제농도(MIC)를 조사하였다(Table 4). 그 결과, Azithromycin, Chloramphenicol, Nalidixic acid, Streptomycine은 균주 간 최소억제농도의 차이가 있었다. 특히 항생제 Nalidixic acid, Streptomycine은 최소억제농도가 sensititre HiQ plate의 최고농도인 128 µg/mL이었으며 추후 더 높은 항생제 농도에서 무름병균의 증식 억제여부를 조사해야 할 것으로 보인다. 그리고 Amikacin (4~64, AMI), Ampicillin (2~64, AMP), Cefotaxime (1~32, FOT), Cefoxitin (4~32, FOX), Ceftazidime (1~32, TAZ), Ceftriaxone (1~32, AXO), Ciprofloxacin (0.03~16, CIP), Colistin (2~16, COL), Gentamicin (1~64, GEN), Imipenem (1~8, IMI), Tetracycline (2~128, TET), Trimethoprim/Sulphamethoxazole (1/19~16 / 304, SXT)의 12종 항생제에 대한 무름병균의 반응은 균주 간 차이가 없이 일정하게 최소 농도에 반응을 보여 해당 항생제에 감수성으로 판단하였다. 세균의 DNA 합성을 저해하는데 효과적인 Quinolone 계열의 Nalidixic acid에 대한 무름병균의 최소억제농도는 4균주에서 128 µg/mL, 3균주에서 64 µg/mL, 14균주에서 4 µg/mL로 균주간 반응이 다양하였다. 이는 최저 조사 농도(2.0 µg/mL) 보다 2배 이상 높은 최소억제농도를 말하는 것으로 전체 조사대상 균주의 58%를 차지하였다. 이 Nalidixic acid 항생제는 인체 및 동물의 요로감염 치료제로 사용하는 것인데도 무름병균에 대하여 다양한 최소억제농도를 보이는 것에 대해서는 향후 항생제 저항성 기작을 포함하여 오염경로 구명 등 구체적인 분석이 필요하다. 인체 동물 수산물 및 식물에 공통적으로 사용하는 Aminoglycoside 계열 스트렙토마이신에 대한 무름병균의 반응도 다양하였다. 스트렙토마이신에 의한 무름병균 최소억제농도가 앞에서 언급한 E-test법으로 조사한 최소억제농도와 유사하게 128 µg/mL에 이르는 3균주를 확인하였고, 최저조사농도(2.0 µg/mL)보다 2배 이상 높은 최소억제반응을 보이는 30균주도 확인하였다. 그리고 Azithromycin, Chloramphenicol도 4.0 µg/mL 농도에서 최소억제반응을 보이는 균주가 90% 이상으로 확인되어 다양한 항생제 반응이 있었다. 이번 연구결과에서는 농산물에서 분리한 무름병균이 농업환경에 사용하지 않는 항생제에 대하여 높은 최소억제농도를 보여서 해당 항생제의 유입경로 분석과 더불어 다양한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 농산물에 발생하는 식물병원세균의 농용항생제 및 의료용 항생제에 대한 최소억제농도를 비교하였다. 식물병원세균인 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*은 스트렙토마이신에 대한 최소억제농도가 2000년대

에 비해 3.54 µg/mL 높아졌으며, 일부 의료용 항생제에 대하여 높거나 다양한 반응을 보였다. 이번 연구결과를 근거로 항생제 내성 유발원인과 오염경로의 추가적인 연구와 항생제 내성 최소화를 위한 작물 및 재배지역 간 연계성 분석이 필요할 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(PJ 015130 농업환경 및 농산물 유래 항생제 내성균 통합감시 기반연구)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Author Information and Contributions

Da-Woon Kim, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-4240-0964>

Na-Ye Seul Kim, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Master, <https://orcid.org/0000-0002-4692-428X>

Chae Rin Kim, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Master student, <https://orcid.org/0000-0001-7072-378X>

Myung-In Jeong, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-8261-7300>

Kwang Kyo Oh, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-5300-2091>

Bo-Eun Kim, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3386-5732>

Jae Gee Ryu, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-7048-6796>

Jieun Jung, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Postdoctoral Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-2380-9198>

Samnyu Jee, Highland Agriculture Research Institute, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-7834-4303>

Kyoung-Yul Ryu, Microbial Safety Division, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-2136-0147>

Conceptualization, Kyoung Yul Ryu, Jae Gee Ryu, Myung-In Jeong and Kwang Kyo Oh

Presentation of methodology, Na-Ye Seul Kim, Chae Rin Kim and Kyoung Yul Ryu

Consultation, Kyoung Yul Ryu, Jieun Jung and Samnyu Jee

Writing- Original Draft Preparation, Dawoon Kim

Writing – Review & Editing, Kyoung Yul Ryu, Jae Gee Ryu and Samnyu Jee

이해상충관계

저자는 이해 상충 관계가 없음을 선언합니다.

Literature cited

- Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A, Ho P, Petersen PJ, et al., 2007. Validation and reproductivity assessment of tigecycline MIC determination by Etest. *J. of Clin. Microbiol.* 45(8):2474-2479.
- Chiou CS, Jones AL. 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology.* 85:324-328.
- Do JW, Min JY, Kim YS, Park, Y, Kim HT, 2020. Detection of fungicidal activities against *Alternaria dauci* causing *alternaria* leaf spot in carrot and monitoring for the fungicide resistance. *Res. Plant Dis.* 26(2):61-71.
- Forster H, McGhee GC, Sundin GW, James EA, 2015. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* in california. *Phytopathology.* 105(10):1302-1310
- Jee SN, Choi JG, Lee YG, Kwon M, Hwang IG, et al., 2020. Distribution of Pectobacterium species isolated in South Korea and comparison of temperature effects on pathogenicity. *Plant Pathol. J.* 36(4):346-354.
- Jones RN, Holliday NM, Rhomberg PR. 2015. Validation of a commercial dry form broth microdilution device(sensititre) for testing tedizolid, a new oxazolidinone. *J. of Clin. Microbiol.* 53(2):657-659.
- Kim SR, Cha MH, Chung DK, Shim WB, 2015. Profile of toxin genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from perilla leaf cultivation area. *J. Fd. Hyg. Safety* 30(1):51-58.
- Korea Crop Protection Association. 2020. Guideline of crop protection products. p 1695. (In Korean)
- Lee MG, Lee HH, Jeong HJ, Cho SJ, Jeong SH, et al., 2021. Antimicrobial resistance and genetic characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from distribution beef in Gwangju. *J. Fd. Hyg. Safety.* 36(2):180-187.
- Lee YS, Kim GH, Song YR, Oh CS, Koh YJ, et al., 2020. Streptomycin resistant isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *Res. Plant Disease.* 26(1):44-47.
- McGhee GC, Guasco J, Bellomo LM, Blumer-Schuette SE, Shane WW, et al., 2011. Genetic analysis of streptomycin-resistant (Sm^R) strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of Sm^R *E. amylovora* in Michigan. *Phytopathology* 101(2):182-191.
- Sundin GW, Wang N, 2018. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 56:161-180.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2021. List of plant disease in Korea. <http://genebank.rda.go.kr/kplantdisease.do>

농산물에서 분리한 무름병균의 항생제 최소 억제농도 조사

김다운¹ · 김나예슬¹ · 김채린¹ · 정명인¹ · 오광교¹ · 김보은¹ · 류재기¹ · 정지은¹ · 지삼녀² · 류경열^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물과, ²농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구소

요 약 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)은 기주범위가 넓고 치명적인 무름병을 일으키는 세균이다. 본 연구는 배추 감자 무 재배지에서 분리한 무름병균의 항생제 반응과 세균특성을 구명하기 위하여 수행하였다. 감자 배추 당근 상추에 대한 병원성은 무름병균을 접종하고 다양한 온도 조건에서 발생한 병징 발생정도에 따라서 평가를 하였다. 겨울배추에서 분리한 무름병균은 4개 작물에서 강한 병원성을 보였고 10~30°C의 넓은 온도에서 동일한 병징을 유발하였다. 그리고 76개 무름병균에 대한 농용항생제 스트렙토마이신과 테트라사이클린의 최소억제농도를 조사하였을 때 4개 균주는 스트렙토마이신 100 µg/mL 이상 농도에서도 생장이 억제되지 않았다. 최근에 분리한 무름병균은 20년전에 분리한 것과 비교할 때 최소억제농도가 2배 수준으로 높아졌음을 확인하였다. 그리고 16종 항생제에 대한 무름병균의 최소억제농도를 조사하였을 때 nalidixic acid에 대해서는 2~128 µg/mL 범위로 조사되었다. 본 결과는 무름병균과 관련된 항생제 감수성 변화의 기초정보가 될 것이며 항생제 저항성 발달에 관련한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

색인어 *Pectobacterium carotovorum*, 항생제 최소억제농도